

Vascular reactivity of SMA in HS group increased compensatorily during early stage of HS (0.0 ~ 1.0 h), and peaked at 0.5h. The pD_2 ($-\log[NE]$) of NE decreased, but the maximal contraction (E_{max}) was above the normal level during 0.0 ~ 1.0 PIH ($P < 0.01$). During the middle and late shock stage, the vascular reactivity decreased gradually. The E_{max} decreased, pD_2 increased, and the E_{max} was below the normal level at 4.0 PIH ($P < 0.01$). The increase of vascular reactivity in treatment group was partially inhibited during early stage after injury ($P < 0.01$). The E_{max} was (2.01 ± 0.22) g/mg at 0.5PIH, which was obviously lower than that in HS group [(2.96 ± 0.18) g/mg, $P < 0.05$]. In decompensated period of HS, the vascular reactivity was improved mildly, which exhibited obvious difference compared with that in HS group at 4.0 and 6.0 PIH ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HIF-1 α mRNA expression in HS group exhibited a time-dependent increase following HS, and peaked at 4.0 PIH ($P < 0.01$), and the iNOS and HO-1 mRNA expression were also gradually increased, reaching the peak value at 2.0 and 4.0 PIH, respectively ($P < 0.01$). The plasma content of CO and NO in whole blood were gradually increased following the shock process when compared with those in normal control group, while the CO content in whole blood in treatment group maintained normal, and the plasma content of NO was obviously decreased compared with that in control group.

Conclusion HS can elicit a dual-phase change in vascular reactivity as previously described. HIF-1 α plays an important role in the occurrence of vascular hyporeactivity following HS.

【Key words】 Shock; Hypoxia-inducible factor 1 α ; Vascular reactivity

研究表明,严重创伤、休克患者在经历缺血缺氧、再灌注损伤以及肠道菌群移位、内毒素释放等的“多重打击”后,常常在失代偿期出现不可逆的组织脏器损伤。究其原因,创伤后失控性炎症反应占有重要地位^[1]。休克后血管反应性降低,导致血压不能有效提升、组织灌注难以改善,愈加受到人们的重视^[2]。缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)调节着细胞对低氧的适应性反应,是迄今为止发现的惟一在缺氧状态下发挥特异性活性的调节分子。HIF-1 α 调节着休克后系统炎症反应的级联放大效应的发生,与组织损伤、功能障碍密切相关,但关于其与血管反应性的关系鲜见报道。本研究旨在探讨 HIF-1 α 在低血容量性休克后血管低反应性形成中的作用。

材料与方 法

一、主要试剂及仪器

RNA 保存液(荷兰 Qiagen 公司),RNA 抽提试剂 Tripure(美国 Roche 公司),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(大连宝生物工程有 限 公 司),一氧化氮(NO)检测试剂盒(深圳晶美生物工程有 限 公 司),寡霉素(Oligomycin,美国 Sigma 公司),紫外分光光度计(美国 Beckman 公司),PTC200 型 PCR 仪(美国 MJ 公司),VDS-CL 凝胶成像系统(美国 Amersham 公司),恒温离体器官灌流浴槽(西班牙 Letica 公司)。

二、动物模型及分组

清洁级 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心)120 只,雌雄不拘,体重(230 ± 30)g。其中 112 只分为休克组和给药组。两组大鼠实验前 12 h 均禁食,可自由饮水。实验日用戊巴

比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,右侧股动脉插管并连接血压计,肝素抗凝,稳定 10 min 后开始放血,使平均动脉压(MAP)于 10 ~ 15 min 内平稳降至 40 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)。于伤后 0.0 (即伤后 10 ~ 15 min)、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h 留取动脉血并处死两组大鼠,在无菌条件下取大鼠肠系膜上动脉(SMA)主干,清除周围结缔组织,制成 2 ~ 3 mm 长的血管环待测。每组每时相点 8 只大鼠。给药组大鼠实验前 4 h 参照文献[3]经腹腔注射寡霉素(9 μ g/kg),其余处理同休克组。另取 8 只大鼠作为正常对照组,不处理,留取以上标本待测。

三、检测指标

1. 血管反应性测定:采用离体血管环张力测定技术测定所取血管环对梯度浓度去甲肾上腺素(NE)的收缩力,以 NE 的 50% 最大效应的负对数克分子浓度(pD_2)和血管环对 NE 的最大收缩反应(E_{max})评价血管反应性^[4]。

2. SMA 血管组织中 HIF-1 α 、血红素氧合酶 1 (HO-1)以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达水平的检测:采用 RT-PCR 半定量法。RNA 抽提试剂 Tripure 提取总 RNA 后,紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度,在波长 260、280 nm 下分别检测吸光度(A)值,要求 $A_{260\text{nm}}:A_{280\text{nm}}$ 比值为 1.7 ~ 2.0。逆转录前 RNA 统一定量为 1.0 μ g。HIF-1 α (498 bp):上游 5'-GGTGCTAACAGATGATGGTGAC-3',下游 5'-GGCTCATAACCCATCAACTCAG-3';iNOS (314 bp):上游 5'-AGCATCCCAAGATACGAGTG-3',下游 5'-GGACCAGCCAAATCCAGT-3';HO-1 (258 bp):上游 5'-GGTCCTGAAGAAGATTCCG-3',下游 5'-GAGG-

GACTCTGTGCTTTGTG-3'。PCR 反应条件:退火温度分别为 56.0、55.5、54.0 °C,循环 30 ~ 34 次。同时扩增 β 肌动蛋白(275 bp)作为内参照,上游 5'-CGGCATTCAGGAACTA-3',下游 5'-CACCTTCACCGTTCAGT-3'。取 PCR 产物 6 μ l,12 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,以目的条带与内参照的 A 值之比 ($A_1:A_2$) 为标准评价结果。

3. 采用连二亚硫酸钠还原法^[5]测定大鼠全血一氧化碳(CO)含量。

4. 硝酸还原酶法检测大鼠血浆 NO 浓度。操作按试剂盒说明书进行。

四、统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件处理,组内自身对照和配对实验数据应用 *t* 检验。组间比较采用方差分析。

结 果

1. 血管反应性的变化规律:(1)与正常对照组比较,休克组伤后早期(0.0~1.0 h)血管反应性增高,伤后 0.5 h 达峰值,表现为剂量-效应曲线左移,Emax 增大,pD₂ 减小。伤后 0.5~1.0 h Emax 值均高于正常对照组 ($P < 0.01$)。至休克中、后期,血管反应性进行性下降,剂量-效应曲线右移,Emax 减小,pD₂ 增大,伤后 4.0 h Emax 低于正常对照组水平 ($P < 0.01$)。(2)与休克组比较,给药组伤后早期(0.0~1.0 h)血管反应性升高部分受抑制 ($P < 0.05$),伤后 0.5 h Emax 低于休克组 ($P < 0.05$)。至休克晚期血管反应性轻度回升,与休克组伤后 4.0、6.0 h 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 1。

2. HIF-1 α , iNOS, HO-1 mRNA 的表达水平:与正常对照组比较,休克组伤后 HIF-1 α mRNA 的表达呈稳步增高,伤后 4.0 h 达峰值 ($P < 0.01$)。iNOS、HO-1 mRNA 亦有逐渐增高的趋势,分别于伤后 2.0、

4.0 h 达峰值 ($P < 0.01$)。见图 1、2。

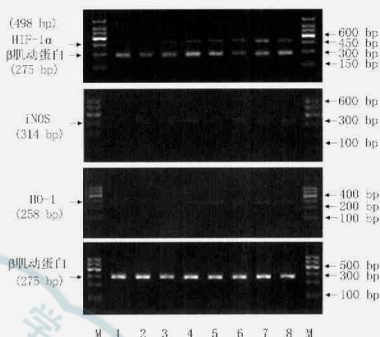


图 1 大鼠 SMA 血管组织中 HIF-1 α , iNOS 和 HO-1 mRNA 的电泳图。M 为 marker; 1. 正常对照组; 2~8. 休克组伤后 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h

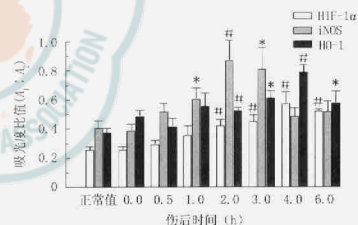


图 2 休克组大鼠 SMA 血管组织中 HIF-1 α , iNOS 和 HO-1 mRNA 的表达水平。与正常值(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

3. 全血 CO 浓度和血浆 NO 的变化:与正常对照组比较,休克组随着病情的发展全血 CO 浓度和血浆 NO 含量呈逐渐升高的趋势。与休克组相比,给药组全血 CO 浓度基本稳定在正常范围内,血浆 NO 含量也明显降低。见表 2。

表 1 各组大鼠肠系膜上动脉血管环对 NE 产生的 Emax 和 NE 的 pD₂ 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(h)							
		0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0	
休克组	56	Emax(g/mg)	1.84 ± 0.07	2.96 ± 0.18*	2.80 ± 0.16*	1.69 ± 0.06	1.40 ± 0.09	1.07 ± 0.05*	0.63 ± 0.07*
		pD ₂	4.40 ± 0.04*	3.72 ± 0.48*	3.10 ± 0.50*	4.69 ± 0.31*	4.75 ± 0.67	5.28 ± 0.31	5.58 ± 0.26
给药组	56	Emax(g/mg)	1.56 ± 0.15	2.01 ± 0.22 Δ	1.88 ± 0.12 Δ	1.85 ± 0.15	1.47 ± 0.16	1.40 ± 0.05 Δ	0.97 ± 0.07 Δ
		pD ₂	4.70 ± 0.09	3.91 ± 0.13*	4.27 ± 0.25*	4.39 ± 0.29*	4.72 ± 0.53	4.75 ± 0.48*	5.33 ± 0.21*

注:伤后 0.0 h 为伤后 10~15 min;正常对照组 8 只大鼠,Emax 值为(1.53 ± 0.05) g/mg, pD₂ 值为 5.13 ± 0.03;与正常对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与休克组比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠全血 CO 浓度和血浆 NO 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间(h)						
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0
休克组							
CO	0.030 9 ± 0.001 8	0.033 2 ± 0.003 1	0.039 4 ± 0.004 0*	0.037 3 ± 0.003 9 [#]	0.044 7 ± 0.004 1 [#]	0.052 7 ± 0.004 8 [#]	0.038 4 ± 0.005 2
NO(μmol/L)	22.8 ± 1.1	23.9 ± 1.5	28.7 ± 1.7	37.6 ± 4.2 [*]	42.4 ± 2.7 [#]	55.2 ± 4.5 [#]	77.6 ± 2.5 [#]
给药组							
CO	0.026 7 ± 0.002 0	0.027 9 ± 0.003 0	0.025 9 ± 0.003 4	0.027 0 ± 0.001 9*	0.023 9 ± 0.002 1 ^{**}	0.025 7 ± 0.002 9 ^{**}	0.028 1 ± 0.001 9
NO(μmol/L)	25.5 ± 2.6	26.2 ± 2.8	27.0 ± 3.3	30.0 ± 2.0	36.7 ± 0.9 [*]	39.8 ± 1.7 ^{*△}	52.0 ± 3.0 ^{**}

注:伤后 0.0 h 为伤后 10~15 min;正常对照组 8 只大鼠,CO 值为 0.026 8 ± 0.000 8,NO 值为 (21.6 ± 0.8) μmol/L;休克组与给药组大鼠各 56 只;与正常对照组比较,* P < 0.05,# P < 0.01;与休克组比较,△ P < 0.05,☆ P < 0.01

讨 论

研究表明,血管低反应性的发生原因与肾上腺素能受体失敏、血管平滑肌细胞膜超极化、钙失敏等综合效应有关^[6]。HIF-1α 是调节细胞对低氧的适应性反应的关键细胞因子,功能涉及能量代谢、细胞增殖及血管形成、重塑与收缩等多方面。HIF 是由 α 和 β 组成的异源二聚体,两者均属于 bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix-Per/ARNT/Ahr/Sim) 家族蛋白,其中 HIF-1α 水平主要依赖于细胞间的氧供,是专一受氧调节的 HIF-1 亚单位,决定了 HIF-1 的活性。HIF-1β 又称芳香受体核转运子,与 HIF-1 的二聚化及活化有关,在细胞核内恒定表达。HIF-1α 的代谢通过脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 使位于其蛋白羧基末端 402 和 564 位的脯氨酸残端羟基化而实现^[7]。

寡霉素为大环内酯类药物衍生物,前期研究认为其作用实质为特异性结合于线粒体 FOF1-腺苷三磷酸(ATP)合酶的寡霉素敏感蛋白(oligomycin sensitive conferring protein, OSCP),可阻断电子传递,引起细胞能量障碍。Gong 等^[8]利用寡霉素处理缺氧的 Hep3B 细胞,可见增强的 HIF-1α 蛋白表达完全被抑制。同时还观察到,寡霉素可特异性提高 PHD 活性,加速细胞内 HIF-1α 的降解,阻止 HIF-1α 蛋白蓄积向核内传递信号,使相应基因的转录水平下降。

本实验结果显示,低血容量性休克可引起血管反应性的双相变化,即早期代偿性增高,晚期进行性下降。低血容量性休克可引起 HIF-1α 及其下游关键酶分子 iNOS、HO-1 mRNA 的表达增加,血浆 NO

含量和全血 CO 浓度上升。寡霉素处理后血管反应性呈相似的双相变化,但变化幅度显著降低;同时血浆 NO 含量和全血 CO 浓度亦部分降低。提示 HIF-1α 在血管低反应性的形成中发挥了重要的调节作用,休克早期 HIF-1α 水平代偿性增加,其轻度表达有利于血管反应性的预适应性保护,为正相关因素。至休克失代偿期,HIF-1α 过度激活、表达并蓄积,激活其相关下游分子如 iNOS、HO-1 等,引起 NO 和 CO 过量释放,进而导致组织脏器损伤和器官功能障碍,两者关系转化为负相关。这一结论亦与前期相关文献报道^[1,9]吻合。

参 考 文 献

- 1 王正国. 创伤基础研究进展. 中华创伤杂志, 2005, 21: 6-10.
- 2 Liu LM, Dubick AM. Hemorrhagic shock induced vascular hyporeactivity of different vasculatures in rats: role of nitric oxide and endothelin. Shock, 2003, 19: 208-214.
- 3 Seo HS, Journe F, Larsimont D, et al. Decrease of estrogen receptor expression and associated ERE-dependent transcription in MCF-7 breast cancer cells after oligomycin treatment. Steroids, 2003, 8: 257-269.
- 4 徐竞, 刘良明. 钙失敏在大鼠失血性休克血管低反应性中的作用. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 20-23.
- 5 Chalmers AH. Simple sensitive measurement of carbon monoxide in plasma. Clin Chem, 1991, 37: 1442-1445.
- 6 刘良明, 胡德耀, 陈惠孙. 循环休克肾上腺素能受体失敏研究进展. 中国病理生理杂志, 1998, 14: 100-103.
- 7 Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5: 343-354.
- 8 Gong YH, Fatou H. Oligomycin inhibits HIF-1α expression in hypoxic tumor cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288: 1023-1029.
- 9 杨宗城. 加强对烧伤后缺血缺氧性损害的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 132-133.

(收稿日期: 2006-06-13)

(本文编辑: 张红)

· 消息 ·

本刊编辑部已开通程控电话

中华烧伤杂志编辑部为提高通讯效率,已开通小程控电话系统。程控电话号码仍为:023-68754670,编辑部各工作人员分机号码如下:王旭 601;付佑梅 602;张红 603;赵敏 604;罗勤 605;莫愚 606;龙景、王珅 607。来电者可在电话接通后直拨分机号码。如有遗忘,电话接通后拨“0”即可收听语音提示。本刊其余电话号码不变:023-65460278,65460398(传真)。